

Best Available Copy

JP 361122565 A

JUN 1986

86-187830/29 804 D16 J04 S03 NIRA 20.11.84
UNITIKA KK *J6 1122-565-A
20.11.84-JP-246942 (10.06.86) C12g-01 C12m-01/34 G01n-30/80
Column chromatography cpts. for enzyme determ. - has computer
to control conditions according to reaction soln. compsn.
C86-081166

The unit comprises:

a chromatography column;
molten liquor introduction mechanism which adds molten liquor
into mixing tank by injecting predetermined quantity at time
intervals on-line;
substrate solution introducing mechanism which introduces
only into mixing tank in predetermined quantity;
detector having a mixer and a unit to measure extinction of
reaction solution;
computer which calculates deviation of output signal corres-
ponding to hourly variation of extinction; and
a unit which controls chromatography conditions and detector
based on the calculation.

Composition variation in molten solution is detected, and
chromatography conditions and detector are controlled
depending on the detected values.

B(4-B2C, 11-C8, 12-K4) D(5-H9) J(1-D1A, 4-B1C) 3

USE/ADVANTAGE

Used for classifying enzymes during separation and
refining of useful enzymes, by measuring activity of enzyme
in molten solution. Detection, estimation and activity measure-
ment can be effected automatically, simply and in a short time.
(7ppW20EDDwgNo0/3).

J61122565-A

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.

128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England

US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101

Unauthorised copying of this abstract not permitted.

435/288

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭61-122565

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)6月10日

G 01 N 30/80

7621-2G

C 12 M 1/34

8412-4B

C 12 Q 1/00

8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑭ 発明の名称 カラムクロマトグラフィー操作法および装置

⑯ 特 願 昭59-246942

⑰ 出 願 昭59(1984)11月20日

⑱ 発 明 者 塩 澤 正 三 横浜市旭区若葉台2丁目19 若葉台団地19棟1111号
⑱ 発 明 者 鹿 島 勝 枚方市北楠葉町29-19
⑱ 発 明 者 武 田 明 京都市左京区田中高原町18番地 和田秀次郎方
⑲ 出 願 人 ユニチカ株式会社 尼崎市東本町1丁目50番地
⑲ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

カラムクロマトグラフィー操作法および装置

2. 特許請求の範囲

1. カラムクロマトグラフィーにおける溶出液を一定溶出量ごとにあるいは一定時間毎に自動的に予め設定した量採取し、採取溶出液を検出手段にかけ溶出液中の成分濃度を検出し、該検出値に応答して、クロマトグラフィー条件および/または検出手段を制御することを特徴とするカラムクロマトグラフィーの操作法。

2. 検出値に応答して溶出液の分画を行なう第1項記載の方法。

3. カラムクロマトグラフィーが酵素分画用であり、検出手段が酵素と基質を反応させ、反応液の吸光度を測定する手段を備えている第1項記載の方法。

4. カラムクロマトグラフィーが蛋白質分画用であり、検出を280nmの吸光度を測定することにより行なう第1項記載の方法。

5. 溶出液のクロマトパターンを得るための第1項記載の方法。

6. (i)酵素精製用クロマトカラム、(ii)該クロマトカラムから流出する溶出液のうち、予め設定された量をオンラインで任意の時間間隔で混合槽に注入添加する溶出液導入機構、1種類以上の酵素に対応した1種類以上の基質液槽から目的の酵素に対応する基質液のみを予め設定された量、該混合槽に導く基質液導入機構、溶出液と基質液を混合する手段および該混合槽中の混合液の反応液の吸光度を測定するための手段を備えた検出手段、(iii)吸光度の時間変化に対応する出力信号の変化を演算するコンピューターおよび(iv)この演算に基づいて酵素活性値を測定してクロマトグラフィー条件および/または検出手段を制御する制御手段を備えたクロマトグラフィー装置。

7. 溶出液を導入機構が、クロマトカラムから流出する溶出液のうち、予め設定された量を任意の時間間隔で貯槽に導く液供給機構と貯槽から予め設定された量の溶出液を採取し混合槽に流入添

加する移動マイクロシリッジとを備えた第6項記載の装置。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、クロマトグラフィーの操作法、特に有用酵素の分離・精製に際し、カラムクロマトグラフィーにおける溶出液中の酵素の活性値を測定し、酵素を分画する装置に関するものである。

従来技術

従来、有用酵素の分離・精製にはカラムクロマトグラフィーが有効な手段であることが知られており、商業規模での酵素生産においても大容量のカラムを用いたカラムクロマトグラフィーが利用されている。しかしながらクロマトカラムからの溶出液は、フラクションコレクターにて一旦多数の容器に分配してたくわえられ、その後各フラクションについて通常は分光光度計を用い酵素活性値を求め、その結果により酵素画分と不要画分とに分離するというようにクロマトカラムからの溶出液の処理に多大な労力と時間を要しかつ分離の

溶出液を一定溶出量ごとにあるいは一定時間毎に自動的に予め設定した量採取し、採取溶出液を検出手段にかけ溶出液中の成分変化を検出し、該検出値にตอบสนองして、クロマトグラフィー条件および/または検出手段を制御することを特徴とするカラムクロマトグラフィーの操作法および装置に関する。

本発明の基本構成を第1図で説明する。

n 種類の成分を含む試料をカラムクロマトグラフィーにかけ溶出液を貯槽に貯える。溶出液が一定の溶出量となったとき、あるいは一定の溶出時間毎に自動的に弁(a)が開き、かつ一定量採取後弁(a)が閉じるよう「溶出量または時間設定手段」および「採取切換弁制御手段」を備えたコンピュータシステムで制御する。採取溶出液を試料中の成分に対応した適当な検出手段、例えば吸光度計、屈折計、電導度計などにより、成分の溶出の有無、濃度等を検出する。検出手段は成分を検出可能な他の成分に変換する手段、例えば成分が酵素の場合、基質との混合、反応、呈色等の手段を包含す

精度を上げようとすればする程フラクションの本数を増さねばならず、非常に煩雑な作業になっている。かつ酵素活性値の測定が終わらなければ溶出液は次の処理に移されず、溶液の状態での放置時間が長くなり、酵素活性値の低下は避けがたい問題となっている。それゆえ、クロマトカラムからの溶出液そのものの酵素活性を連続的に測定し酵素画分と不要画分とを分離することにより操作性の向上及びクロマト操作中の酵素の失活の軽減を図れる装置が切望されていた。

発明が解決しようとする問題点

本発明は、クロマトカラムからの溶出液を任意の溶出量ごとにあるいは時間間隔で予め設定した量採取できる装置を組み入れ、該溶出液に含まれる有用成分の量を連続的に測定し、その量に基づきクロマトグラフィーの操作条件を制御し、溶出液を分画する方法および装置を提供することを目的とする。

問題点を解決するための手段

本発明は、カラムクロマトグラフィーにおける。検出が終了すると「排液切換弁制御手段」により弁(b)が開き排液する。検出されたデータは操作制御手段にインプットされる。操作制御手段は目的とする制御に対応したプログラムを備えている。例えば所要成分の分取を目的とするクロマトグラフィーでは、所要成分が検出されないときは、弁(c)を用いて溶出液を排液し、所要成分が検出されると弁(c)を閉じ、弁(l)を開いて、溶出液を分取する。所要成分が n 種ある場合はそれぞれ対応して弁(l)～弁(n)を開閉するプログラムを組めばよい。必要ならば、操作制御手段は、貯槽中の溶出液量を制御するためのプログラム、弁(a)制御のための信号を採取切換弁制御手段に送るためのプログラム、検出手段制御のためのプログラムを備えていてもよい。例えば分取を必要としないクロマトグラフィーの場合は、弁(c)の制御により貯槽中の溶出液の量を制御し、あるいは溶出液中の溶出成分が多い場合は採取量を減少させ、また、溶出される成分の種類に応じて吸光度計の波長を自動的に最適値に合わせる等の制御

を行なう。

本発明方法の典型的応用例は、カラムクロマトグラフィーによる酵素の自動分画である。前述のごとく、クロマトグラフィーによる酵素の分画は従来フラクションコレクター等で分取した成分の酵素活性をそれぞれのフラクションについて測定し、所要分画を集めると云う極めて、煩わしい手法がとられていたが、本発明では簡単かつ短時間にこれを行なうことができる。

本発明はこの様な酵素分画用クロマトグラフィー装置も包含する。本発明装置は「クレーム6」に関する。

この様な具体例を第2図にもとづいて説明する。

第2図においてクロマトカラムからの溶出液は、溶出液導入機構によって混合槽に導かれる。即ち、コンピュータ(16)の指令により採取切換弁(1)を介し任意の時間間隔で恒温槽(19)内の貯槽(2)に導かれ、貯槽(2)にたくわえられた溶出液は、短時間放置され加温されて所定の温度になった後、移動可能なマイクロシリンジ(4)により一定量分

ンプ(10)により混合槽(12)に導き、混合装置(13)により混合後、微量定量ポンプ(18)により切換弁(14)を介して排液ライン(20)に導くという洗浄操作を毎回の測定ごとに行なうことにより、測定1サイクルに要する時間の短縮はかれる。かつ貯槽(2)にたくわえられた溶出液は1回分取した後、ポンプ(10)により排出され、切換弁(1)より新たな溶出液を導く。1つの溶出液について複数の種類の酵素活性値を測定する場合には、1回の測定毎に洗浄液槽(9)から、洗浄液を微量定量ポンプ(8)により供給し、混合槽(12)と共に切換弁(7)以降のラインの洗浄も同時に行なうことが必要である。その後、測定したい酵素に対する基質液を基質液槽(5)から切換弁(7)を介し混合槽(12)に導き、溶出液は貯槽(2)にたくわえられているものをマイクロシリンジ(4)により混合槽(12)に注入する。

以上詳述したような装置を用いて実施した結果を第3図に示す。

実施例

第3図は、イオン交換樹脂を用いて、好熱性細

取され、その後マイクロシリンジ(4)の移動により混合槽(12)に注入添加される。混合槽(12)には、予め測定しようとする酵素に対する基質液が基質液導入機構、即ち基質液槽(5)からエア-抜き装置(6)を通り基質切換弁(7)を介し、微量定量ポンプ(8)により、一定量導かれている。混合槽(12)中の基質液に溶出液が添加されれば、混合装置(13)により攪拌され、ただちに微量定量ポンプ(18)により流通型の吸光度測定装置(15)に導かれる。基質液と溶出液との反応液は、吸光度測定装置(15)内に一定時間とどまり、その間の吸光度の値の変化をコンピュータ(16)に送る。コンピュータ(16)においては、反応の進行に伴う吸光度の時間的变化よりただちに活性値を演算し、この活性値をもとに酵素画分が不要画分かを判断する。任意の時間間隔で溶出液について同じ種類の酵素の活性値を連続して測定する場合は、溶出液と基質液を混合後、吸光度測定装置(15)に送り、吸光度変化の測定中に2つの切換弁(14)、(17)を排液ライン(20)に通ずる様に切換え、洗浄液(11)を微量ボ

菌バチルス・ステアロサームフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のアデニレートキナーゼ(AdK)とグルコキナーゼ(GluK)を分離し、クロマトカラムからの溶出と同時に両酵素画分を分画した時の両酵素活性値の時間的变化を表わしたものである。あらかじめAdKとGluKに対する基質溶出を基質液槽(第2図中(5))に各々準備しておいた。イオン交換樹脂にAdKとGluKを含んだ試料を供給し、両酵素を樹脂に吸着させた後、AdKを溶出させる溶離液である0.1MKClを含有した緩衝液を供給した。次に溶出液を一定間隔で採取切換弁(第2図中(1))から導き、AdKの活性値を測定した。AdKの活性値があらかじめ定めた値以上の時、すなわち t_1 から t_2 まで切換弁(第2図中(3))を切換え、容器に回収した。次にGluKを溶出させる溶離液である0.2MKClを含有した緩衝液を供給し、同様にGluKの活性値を測定し、ある一定値以上の時、すなわち t_3 から t_4 まで、同様にして別の容器に回収した。AdKに対応する基質溶

特開昭61-122565 (4)

液は、AMP、ATP、PEP、NADH、PK 及び LDH を含んでおり、NADH の減少速度を 340 nm の吸光度変化により検出し、AdK の活性値を算出した。また GluK に対応する基質溶液はグルコース、ATP、NADP、及び G6PDH を含んでおり、NADPH の増加速度を 340 nm の吸光度変化により検出し、GluK の活性値を算出した。この例では、酵素は、2 種類であるが、酵素の数に制限はない。また基質溶液の選択、溶出液の導入間隔及び回収すべき活性値等の操作条件は、あらかじめマイクロコンピュータに記憶させておいた。応用例は、もちろん他にも多数考えられ、その 1 つとしてももちろん溶出液のクロマトパターンを求めるいわゆる分析の目的のためだけに本装置を用いることも出来る。また、溶出液のライン中に波長 280 nm の吸光度を検出することにより、溶出液中の蛋白質の濃度が求まり、酵素の活性測定値とから比活性が求められ、その値により、所要画分の回収又は廃棄、更にはクロマトカラム入口液の条件の制御も可能である。

発明の効果

本発明方法を用いると、カラムクロマトグラフィーの溶出液に含まれる成分の検出、定量、活性値の測定を自動的に行なえる他、自動分画、検出条件の自動制御等を簡単かつ短時間に行なうことができる。また、この方法を、酵素の分離精製に応用するときはクロマトカラムからの溶出液中に含まれる多種の酵素の活性値が自動的にオンラインで測定でき、その値をもとにして必要な酵素画分のみを分取することにより時間と労力を大幅に節減でき、操業性の向上及びクロマト操作中の酵素の失活の軽減を図れる。かつ吸光度測定装置と排液ラインとの 2 流路を設ける事により吸光度の変化を測定している間に洗浄操作ができ、さらに時間の節約ができる。さらに複数の酵素を 1 回のカラムクロマトグラフィーによって分離精製する場合にも本発明によればクロマトカラムからの溶出液に含まれる複数の酵素の活性値が、自動的に連続的に測定でき、その値をもとにして複数の酵素を種類ごとに分取することができる。

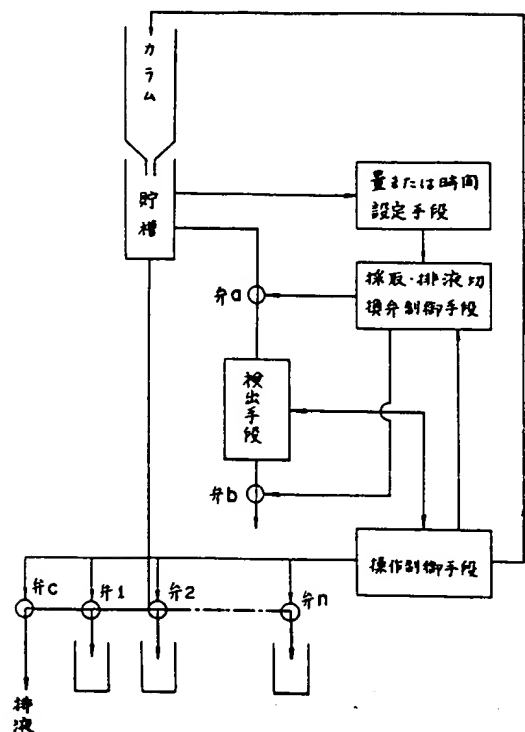
4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明方法の基本的な制御機構を示すフローチャート、第 2 図は酵素活性測定機構を示す図および第 3 図は酵素活性測定結果を示す図である。

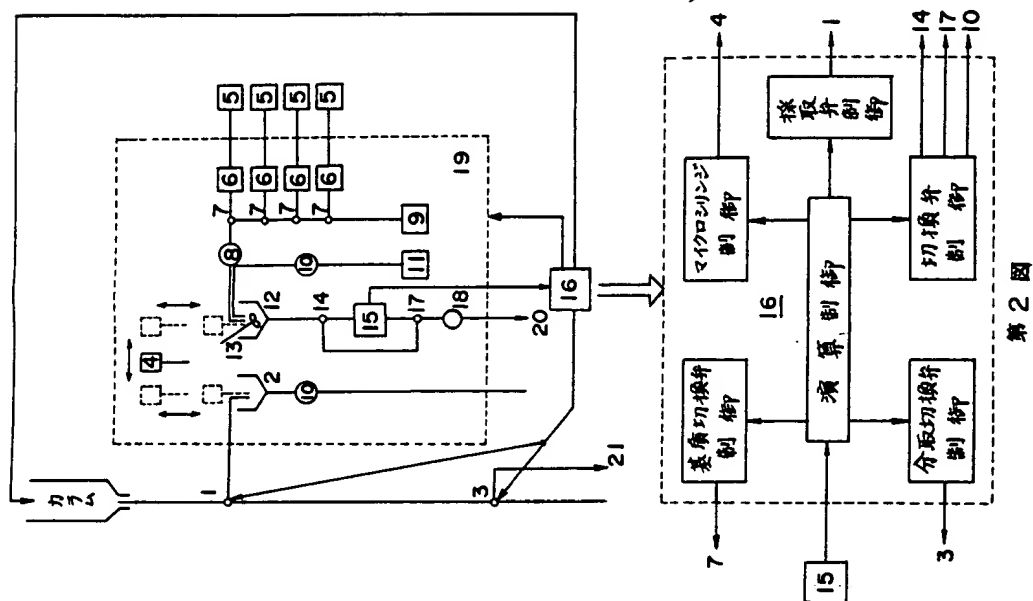
- (1), (3), (7), (14), (17) 切換弁、
- (2) 貯槽、 (4) マイクロシリンジ、
- (5) 基質液槽、 (6) エアー抜き装置、
- (8), (18) 微量定量ポンプ、
- (9), (11) 洗浄液槽、 (10) ポンプ、
- (12) 混合槽、 (13) 混合装置、
- (15) 吸光度測定装置、 (16) コンピュータ、
- (19) 恒温槽、 (20), (21) 排液ライン。

特許出願人 ユニチカ株式会社

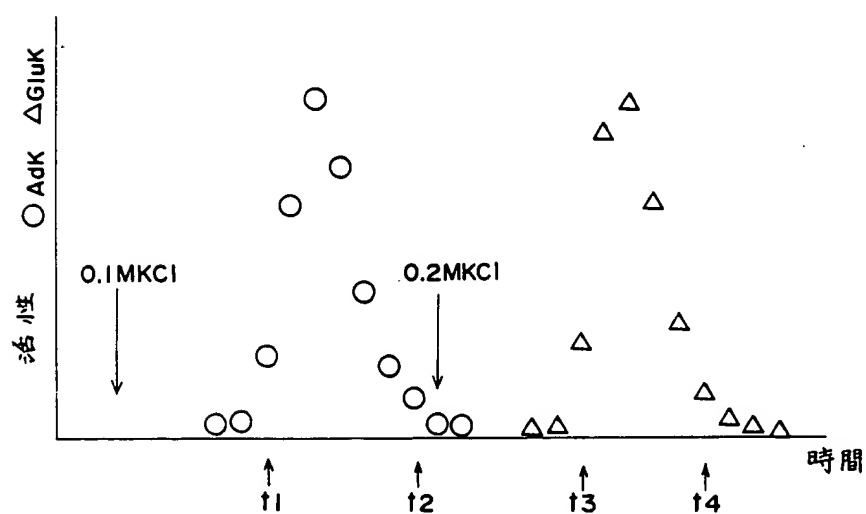
代理人 弁理士 青山 森 ほか 2 名



第 1 図



第2図



第3図

手続補正書 (自 発)

昭和 60 年 3 月 15 日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示

昭和 59 年特許願第 246942 号

2. 発明の名称

カラムクロマトグラフィー操作法および装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

名称 (450) ユニチカ株式会社

代表者 平 田 豊

4. 代 理 人

住所 大阪府大阪市東区本町2-10 本町ビル内

氏名 弁理士 (6214) 青 山 篠 ほか 2 名

5. 補正命令の日付 (自発)

6. 補正の対象 (1)明細書の「特許請求の範囲」および「発明の詳細な説明」の欄 (2)図 面

[別 紙]

特許請求の範囲

1. カラムクロマトグラフィーにおける溶出液を一定溶出量ごとにあるいは一定時間毎に自動的に予め設定した量採取し、採取溶出液を検出手段にかけ溶出液中の成分濃度を検出し、該検出値にตอบสนองして、クロマトグラフィー条件および/または検出手段を制御することを特徴とするカラムクロマトグラフィーの操作法。

2. 検出値にตอบสนองして溶出液の分画を行なう第1項記載の方法。

3. カラムクロマトグラフィーが酵素分画用であり、検出手段が酵素と基質を反応させ、反応液の吸光度を測定する手段を備えている第1項記載の方法。

4. カラムクロマトグラフィーが蛋白質分画用であり、検出を280nmの吸光度を測定することにより行なう第1項記載の方法。

5. 溶出液のクロマトパターンを得るための第1項記載の方法。

特開昭61-122565 (6)

7. 補正の内容

(1) 明細書の「特許請求の範囲」の欄を別紙の通り訂正する。

(2) 明細書第5頁第10行~第12行、「溶出液を貯槽に……弁(a)が開き、」とあるを「溶出液を予め設定した溶出時間毎に自動的に弁(a)を開けて、」に訂正する。

(3) 同第10頁第7行、「溶出」とあるを「溶液」に訂正する。

(4) 図面の「第1図」を別紙の通り訂正する。

以 上

6. (i)酵素精製用クロマトカラム、(ii)該クロマトカラムから流出する溶出液のうち、予め設定された量をオンラインで任意の時間間隔で混合槽に注入添加する溶出液導入機構、1種類以上の酵素に対応した1種類以上の基質液槽から目的の酵素に対応する基質液のみを予め設定された量、該混合槽に導く基質液導入機構、溶出液と基質液を混合する手段および該混合槽中の混合液の吸光度を測定するための手段を備えた検出手段、(iii)吸光度の時間変化に対応する出力信号の変化を演算するコンピューターおよび(iv)この演算に基づいて酵素活性値を測定してクロマトグラフィー条件および/または検出手段を制御する制御手段を備えたクロマトグラフィー装置。

7. 溶出液を導入機構が、クロマトカラムから流出する溶出液のうち、予め設定された量を任意の時間間隔で貯槽に導く液供給機構と貯槽から予め設定された量の溶出液を採取し混合槽に流入添加する移動マイクロシリッジとを備えた第6項記載の装置。

第1図

